

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 octobre 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/72762 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07H 15/04, 5/06, 11/00, 7/033,
C08B 37/00, A61K 31/70, A61P 29/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00903

(22) Date de dépôt international : 26 mars 2001 (26.03.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/03910 28 mars 2000 (28.03.2000) FR

(71) Déposant : AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs: MOURIER, Pierre; 1 rue Etienne Mehul, F-94220 Charenton Le Pont (FR). PERRIN, Elisabeth; 23 rue Poitevin, F-27000 Evreux (FR). VISKOV, Christian; 3 rue du Béam, F-91130 Ris Orangis (FR).

(74) Mandataire : MORVAN, Michèle; Aventis Pharma S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (regional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

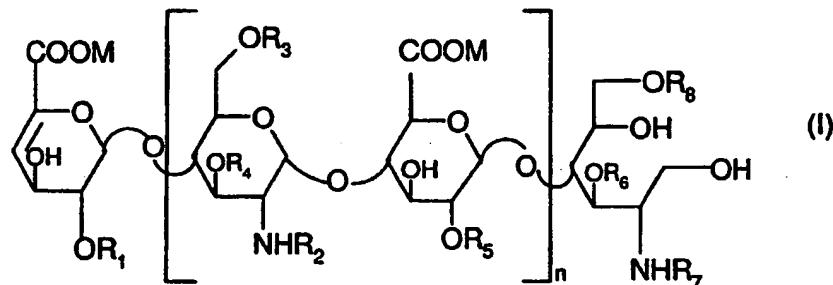
Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING OLIGOSACCHARIDES AND PREPARATION THEREOF

(54) Titre : COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT DES OLIGOSACCHARIDES ET LEUR PREPARATION

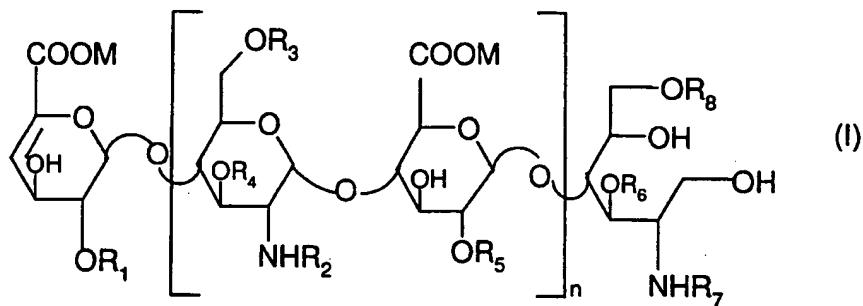


(57) Abstract: The invention concerns pharmaceutical compositions containing as active principle an oligosaccharide or formula (I) or a mixture of said oligosaccharides, novel oligosaccharides of formula (I), mixtures thereof and methods for preparing them.

(57) Abrégé : La présente invention concerne les compositions pharmaceutiques contenant en tant que principe actif un oligosaccharide de formule (I) ou un mélange de ces oligosaccharides, les nouveaux oligosaccharides de formule (I), leurs mélanges et leurs procédés de préparation.

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT DES OLIGOSACCHARIDES ET LEUR PREPARATION

La présente invention concerne les compositions pharmaceutiques contenant en tant
 5 que principe actif un oligosaccharide de formule :



ou un mélange de ces oligosaccharides, les nouveaux oligosaccharides de formule (I), leurs mélanges et leurs procédés de préparation.

Dans la formule (I) n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₈, identiques ou
 10 différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₇, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium.

Ces oligosaccharides comportent ainsi un nombre pair de saccharides.

Dans la formule (I) R₄ et R₆ sont, de préférence, des atomes d'hydrogène.

15 Des oligosaccharides de formule (I) pour lesquels n est égal à 0, et soit R₁, R₆ et R₈ représentent un atome d'hydrogène, R₇ représente un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, soit R₁ et R₆ représentent un atome d'hydrogène, R₇ représente un radical COCH₃, R₈ représente un radical SO₃M et M est sodium, soit R₆ représente un atome d'hydrogène, R₁, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M et M est sodium ont déjà été

décrits par G.H. LEE et coll., J. Chromat. 212, 65-73 (1981) mais aucune propriété pharmacologique n'est décrite pour ces produits.

Des oligosaccharides de formule (I) pour lesquels n est égal à 0 et soit R₆ et R₇ représentent des atomes d'hydrogène, R₁ et R₈ représentent un radical SO₃M et M est sodium, soit R₁, R₆ et R₇ représentent un atome d'hydrogène, R₈ représente un radical SO₃M et M est sodium sont décrits par MW McLEAN et coll., Eur. J. Biochem., 5 1984, 145, 607, sans aucune indication d'activité pharmacologique.

Les compositions pharmaceutiques préférées sont celles contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel :

10 - n est un entier de 0 à 10 et, en particulier de 0 à 6 et encore plus particulièrement de 1 à 6.

- R₁, R₂, R₃, R₅, R₇, R₈ sont identiques ou différents et représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M et, en particulier R₁, R₂, R₃, R₅, R₇, R₈ sont des radicaux SO₃M,

15 - M est sodium.

Les compositions pharmaceutiques particulièrement préférées sont celles contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel :

- n est égal à 0, R₁, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₆ représente un atome hydrogène et M est sodium,

20 - n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

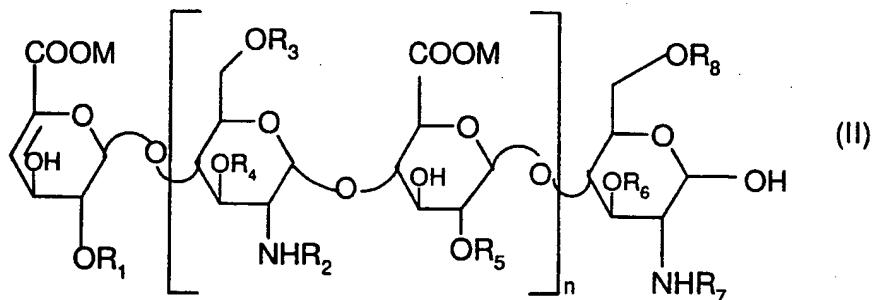
- n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,

- n est égal à 3, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium,
- n est égal à 4, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

5 Les oligosaccharides de formule (I) à l'exception de ceux pour lesquels n est égal à 0 et soit R₁, R₆ et R₈ représentent un atome d'hydrogène, R₇ représente un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, soit R₁ et R₆ représentent un atome d'hydrogène, R₇ représente un radical COCH₃, R₈ représente un radical SO₃M et M est sodium, soit R₆ représente un hydrogène, R₁, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M et M est sodium et

10 10 R₆ et R₇ représentent des atomes d'hydrogène, R₁ et R₈ représentent un radical SO₃M et M est sodium, soit R₁, R₆ et R₇ représentent un atome d'hydrogène, R₈ représente un radical SO₃M et M est sodium sont nouveaux et en tant que tels font partie de l'invention.

Les oligosaccharides de formule (I) peuvent être préparés par action d'un borohydrure 15 de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire sur des oligosaccharides de formule :



dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₈, identiques ou 20 différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₇, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium.

Cette réaction s'effectue en milieu aqueux, à une température voisine de 25°C, à un pH compris entre 7 et 10 et de préférence entre 9 et 10, pendant toute la durée de la réaction. Le maintien du pH est obtenu par addition d'une solution de soude à 0,5 mol/l. La réaction est arrêtée par acidification du milieu réactionnel, par exemple

5 par addition d'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5.

Comme borohydrure de métal alcalin, on peut citer le borohydrure de lithium, de sodium et de potassium.

Comme borohydrure d'ammonium quaternaire, on peut citer le borohydrure de tétrabutylammonium.

10 Les oligosaccharides de formule (II) peuvent être obtenus par séparation par chromatographie sur gel d'un mélange d'oligosaccharides (III) obtenu par dépolymérisation enzymatique de l'héparine ou dépolymérisation basique de l'ester benzylique de l'héparine ou d'un ester benzylique d'héparine d'hémisynthèse.

Cette chromatographie s'effectue sur des colonnes remplies de gel de type 15 polyacrylamide-agarose tel que celui commercialisé sous la marque Ultrogel ACA202^R (Biosepra). De préférence, on utilise une batterie de colonnes de gel polyacrylamide agarose. Le nombre de colonnes utilisées est adapté en fonction du volume, du gel et des oligosaccharides à séparer. Le mélange est élué par une solution contenant un tampon phosphate et du chlorure de sodium. De préférence, la solution

20 tampon phosphate est une solution à 0,02 mol/l de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 7) contenant 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La détection des différentes fractions est réalisée par spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les fractions ainsi obtenues peuvent ensuite être éventuellement purifiées par exemple par chromatographie SAX (strong anion exchange) selon les méthodes connues de l'homme du métier et

25 notamment selon les méthodes décrites par K.G. Rice et R.J Linhardt, Carbohydrate Research 190, 219-233 (1989), A. Larnkjaer, S.H. Hansen et P.B. Ostergaard, Carbohydrate Research, 266, 37-52 (1995) et dans le brevet WO90/01501 (exemple

2). Les fractions sont ensuite lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel telle qu'une colonne de gel Séphadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Lorsque la purification n'est pas réalisée par chromatographie SAX, les lyophilisats peuvent être éventuellement purifiés par précipitation simple ou fractionnée selon les 5 méthodes connues de l'homme du métier et notamment selon la méthode décrite dans le brevet FR2548672. De façon générale, on opère selon le protocole suivant :

La fraction lyophilisée à purifier est dissoute à 25°C dans environ dix volumes d'eau distillée. Par ajout de méthanol ou d'éthanol, on fait précipiter l'oligosaccharide désiré en contrôlant son enrichissement par chromatographie CLHP 10 (Chromatographie Liquide Haute Performance). L'ajout de méthanol ou d'éthanol est déterminé en fonction de la pureté et du rendement désiré du dit oligosaccharide. De même, cette opération peut être réalisée en plusieurs étapes successives à partir de la solution initiale de lyophilisat. Pour cela, on rajoute l'agent insolubilisant (méthanol ou éthanol) par petites portions et on isole après chaque ajout le précipité obtenu. Les 15 précipités ainsi préparés sont analysés par chromatographie CLHP. Selon la pureté et le rendement désiré, on rassemble les fractions adéquates de précipité.

Selon une variante de la présente invention, la fraction lyophilisée à purifier peut être dissoute dans 10 à 200 volumes d'eau contenant de 0 à 30% d'acétate de sodium. Le pourcentage d'acétate de sodium sera ajusté au préalable en fonction de la nature de 20 l'oligosaccharide à traiter (fonction de la taille). Par ajout de méthanol, on fait précipiter l'oligosaccharide désiré en contrôlant son enrichissement par chromatographie CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance). L'ajout de méthanol est déterminé en fonction de la pureté et du rendement désiré du dit oligosaccharide. De même, cette opération peut être réalisée en plusieurs étapes 25 successives à partir de la solution initiale de lyophilisat. Pour cela, on rajoute l'agent insolubilisant (méthanol) par petites portions et on isole après chaque ajout le précipité obtenu. Les précipités ainsi préparés sont analysés par chromatographie

CLHP. Selon la pureté et le rendement désiré, on rassemble les fractions adéquates de précipité.

Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1$ ou 2 , il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation enzymatique.

- 5 Cette dépolymérisation s'effectue au moyen d'héparinase I (EC 4.2.2.7), au sein d'une solution tampon phosphate de pH7, en présence de chlorure de sodium et de BSA (Albumine de Sérum Bovin), à une température comprise entre 10 et 18°C et, de préférence 15°C , pendant 8 à 10 jours et, de préférence, 9 jours. La dépolymérisation est arrêtée par exemple par chauffage du milieu réactionnel à 100°C pendant
- 10 2 minutes et le mélange est récupéré par lyophilisation. Il est préférable d'utiliser 7 UI d'héparinase I pour 25 g d'héparine. La solution tampon phosphate comprend généralement $0,05$ mol/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7) en présence de $0,1$ mol/l de chlorure de sodium. La concentration en BSA est généralement de 2% .

- 15 Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1, 2, 3$ ou 4 , il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation d'un ester benzylique de l'héparine.

L'ester benzylique de l'héparine peut être préparé selon les méthodes décrites dans les brevets US5389618, EP40144, FR2548672. Le taux d'estérification sera de préférence compris entre 50 et 100% . De façon préférentielle, il sera compris entre

- 20 70 et 90%.

La dépolymérisation s'effectue en milieu aqueux, au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin (hydroxyde de lithium, soude, potasse ou hydroxyde de césum par exemple) ou d'un hydroxyde d'ammonium quaternaire (hydroxyde de tétrabutylammonium par exemple), de préférence, à une molarité comprise entre $0,1$ et $0,2$ mol/l, à une température comprise entre 40 et 80°C , pendant 5 à 120 minutes. Dans un mode préféré, on opère pendant 5 à 15 minutes, à une température comprise entre 60 et 70°C , avec une solution d'hydroxyde de sodium $0,15$ mol/l. La réaction de

dépolymérisation est arrêtée par neutralisation par addition d'un acide tel que l'acide acétique. Après addition de 10% en poids par volume d'acétate de sodium, le mélange d'oligosaccharides est précipité par addition de méthanol, de préférence, 2 volumes pour 1 volume de milieu réactionnel et filtré.

- 5 Selon un aspect préféré de l'invention, le mélange d'oligosaccharides obtenu après dépolymérisation chimique, sous forme d'une solution aqueuse, est enrichi par ultrafiltration sur membranes avec un seuil de coupure nominal approprié (type Pellicon en cellulose régénérée commercialisées par Millipore); le type de membrane étant adapté en fonction du type d'oligosaccharides enrichis à récupérer. Pour les
- 10 oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 0$, on utilisera une membrane de seuil de coupure nominal de 1 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 1$, on utilisera une membrane 1 kDa ou 3 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 2$, on utilisera une membrane 3 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 3$ ou 4, on utilisera une membrane 5 kDa. Au cours de cette opération, le perméat
- 15 est récupéré et le rétentat rejeté. Ainsi, la fraction de produit enrichi peut représenter de 50 à 10% du mélange d'oligosaccharides initial tout en conservant au moins 80% de l'oligosaccharide désiré.

Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0$ à 25, il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation d'un ester benzylique de

20 polysaccharide sulfaté d'hémisynthèse. L'ester benzylique de polysaccharide sulfaté d'hémisynthèse est préparé à partir de polysaccharides sulfatés d'hémisynthèse obtenus à partir du polysaccharide K5 et selon les méthodes décrites dans les brevets WO94/29352 et WO96/14425. Les conditions d'estérification, de dépolymérisation et de récupération sont les mêmes que celles décrites précédemment pour l'ester

25 benzylique d'héparine.

Dans tous les procédés précédents, l'héparine initiale peut être d'origine porcine, ovine, caprine ou bovine et peut provenir des mucus, poumons ou peaux des animaux.

De préférence, on utilise une héparine de mucus porcin, ovin ou de poumons de boeuf et encore plus préférentiellement de mucus porcin ou de poumon de boeuf.

Les oligosaccharides de formule (I) présentent des propriétés anti-inflammatoires et peuvent ainsi être utilisées pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de substances cytotoxiques telle que le monoxyde d'azote (NO) dont la forme inductible est libérée notamment par les neutrophiles ou les macrophages lorsque ceux-ci migrent et sont activés au niveau d'un tissu. La migration, l'activation et l'adhésion des neutrophiles se produit au niveau des zones tissulaires ischémiques à la suite d'une occlusion ou d'un spasme d'une artère vascularisant ce tissu. Ces ischémies peuvent se produire soit au niveau cérébral (accident vasculaire cérébral), soit au niveau du myocarde (infarctus du myocarde), soit au niveau des membres inférieurs (ischémies dites périphériques). Les oligosaccharides de formule (I) peuvent ainsi être utilisées pour la prévention et/ou le traitement des maladies neurodégénératives pour lesquelles l'inflammation cérébrale joue un rôle délétère pouvant conduire à la mort parmi lesquelles on peut citer les ischémies cérébrales, les ischémies cardiaques (infarctus du myocarde), les ischémies périphériques, les traumatismes du système nerveux central et notamment les traumatismes crâniens, spinaux et crano-spinaux, la sclérose en plaques, les douleurs neuropathiques et les neuropathies périphériques, les maladies du motoneurone dont la sclérose latérale amyotrophique, l'atrophie spinale progressive, l'atrophie musculaire infantile et la sclérose latérale primaire, le neuro-sida, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington et certaines formes d'ostéoarthrites notamment à localisation articulaire.

L'activité anti-inflammatoire de ces produits est démontrée *in vivo* dans le test de production de NOx (nitrite et nitrate) induite par un lipopolysaccharide (LPS) provenant d'E. Coli selon le protocole décrit par M. YAMASHITA et coll., Eur. J. Pharmacol., 338, 2, 151-158 (1997) ou J.E. SHELLITO et coll. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 13, 1, 45-53 (1995).

On injecte, à des souris CD1 mâles (Charles River, 25-35g), à T0 par voie intraveineuse bolus 0,5 mg/kg de l'oligosaccharide, à T+15 minutes, par voie sous-cutanée 1 ou 2 mg/kg de l'oligosaccharide. A T+30 minutes, on administre 100 mg/kg de lipopolysaccharide (LPS) provenant d'E. Coli (Sigma L3129, sérotype 0127:B8). A

5 T+3 heures on injecte à nouveau par voie sous-cutanée 1 ou 2 mg/kg de l'oligosaccharide. A T+5 heures 30 minutes, un échantillon de sang est récupéré par ponction à l'oeil et les concentrations en NOx (nitrite et nitrate) dans le plasma sont déterminées avec la méthode colorimétrique de Griess après réduction du nitrate en nitrite par nitrate réductase de la manière suivante : 12 ml de l'échantillon de plasma
10 sont mélangés avec 88 ml d'eau déionisée et incubés dans le noir 1 heure à température ambiante avec 40 ml de tampon phosphate (0,31M, pH 7,5). 20 ml de β -NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) (0,86mM), 20 ml de FDA (flavine adénine dinucléotide) (0,11 mM) et 20 ml de nitrate réductase (2U/ml) (Boehringer Mannheim). 10 ml de ZnSO₄ (1M) sont ajoutés pour précipiter les
15 protéines et après mélange, les échantillons sont centrifugés à 20 000g pendant 5 minutes. Finalement, 50 ml du supernageant sont incubés 10 minutes à température ambiante avec 100 ml du réactif de Griess (sulfanilamide à 1 % dans un mélange acide phosphorique/naphtylénediamine 0,1% dans l'eau déionisée (V/V)). Les densités optiques sont lues à 540 nm avec un spectrophotomètre microplaques;
20 chaque point étant déterminé 2 fois. KNO₃ et NaNO₂ sont utilisés comme standard pour la méthode colorimétrique.

Dans ce test, les oligosaccharides selon l'invention inhibent à plus de 50 % la formation de NOx.

Par ailleurs, les oligosaccharides de formule (I) augmentent la survie et la croissance
25 des motoneurones et sont donc particulièrement utiles dans la prévention et/ou le traitement des maladies motoneuronales telles que la sclérose latérale amyotrophique, l'atrophie spinale progressive, l'atrophie musculaire infantile, la sclérose latérale primaire.

Il est connu que les cultures de motoneurones meurent par apoptose si elles sont effectuées en absence de support trophique (BDNF, NT5 par exemple). Il a maintenant été trouvé que les oligosaccharides selon l'invention permettent la survie et la croissance des motoneurones. Cette activité a été testée sur des co-cultures 5 d'astrocytes et de motoneurones privées de facteur neurotrophique selon le protocole suivant :

CULTURES ENRICHIES EN MOTONEURONES :

Les cultures enrichies en motoneurones sont préparées en utilisant la méthode de centrifugation décrite par R.L. SCHNAAR et A.E. SCHAFFNER, J. Neurosci., 1, 10 204-217 (1981) et modifiée par W. CAMU et C.E. HENDERSON, J. Neurosci. Methods, 44, 59-70 (1992). Des moelles épinières d'embryons de rat E15 sont disséquées stérilement et débarrassées des cordes spinales dorsales. Elles sont ensuite coupées et incubées 15 minutes à 37°C dans du PBS (phosphate buffer saline : NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 6,45 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM) auquel on a ajouté 15 0,05% de trypsine. La dissociation des cellules est complétée par trituration avec l'extrémité d'une pipette de 1 ml dans le milieu de culture additionné de 0,1% d'albumine de serum bovin (BSA) et de 0,1 mg/ml de ADNase. La suspension de cellules est étalée sur une bande de métrizamide 6,5% poids/volume dans du milieu L15 (commercialisé par Gibco BRL) et centrifugée à 500 g pendant 15 minutes. La 20 bande de l'interface contenant les motoneurones est récupérée, diluée dans du milieu L15 et incubée 45 minutes à température ambiante dans des boites de culture préalablement enduites d'anti-IgG de souris et de supernageant hybridome MC192 (Chandler CE et coll., J. Biol. Chem., 259, 6882 (1984)). Les cellules suspendues sont lavées avec du milieu L15 et les motoneurones sont élués sous faible agitation avec 25 du supernageant hybridome MC192. Les motoneurones sont étalés à une densité de 650 cellules pour 24 mm dans des boites de culture sur les monocouches d'astrocytes dans du milieu L15 auquel on a ajouté du bicarbonate de sodium (22mM), de la coalbumine (0,1 mg/ml), de la putrescine (0,1 mM), de l'insuline (5 µg/ml), du sélénite de sodium (31 nM), du glucose (20 mM), de la progestérone (21 nM), de la

pénicilline (100 UI/ml) et de la streptomycine (100 ug/ml). Les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

CULTURE D'ASTROCYTES DE MOELLE EPINIERE :

Les astrocytes sont obtenus à partir d'embryons de rats selon la méthode de R.P. SANETO ET J. DE VELLIS, in Neurochemistry, a practical approach (A.J. TURNER et H.S. St JOHN) IRL Press, Oxford-Washington DC, p27-63 (1987) légèrement modifiée. Les moelles épinières sont disséquées stérilement, débarrassées des méninges et des ganglions dorsaux. Cinq à dix moelles épinières sont transférées dans du PBS (phosphate buffer saline : NaCl 137 mM, Kcl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 6,45 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM) et coupées avant incubation à 37°C pendant 25 minutes dans du PBS auquel on a ajouté 0,25% de trypsine. Le traitement enzymatique est stoppé par addition de 10 ml de milieu Dubelcco-Eagle modifié (DMEM) auquel on a ajouté 10% de sérum foetal de veau (FCS) et les cellules sont collectées par centrifugation. Une autre étape de dissociation mécanique est effectuée en utilisant l'extrémité d'une pipette de 1 ml. Les cellules sont étalées à une densité de 1,5x10⁶ cellules pour 25 cm² de milieu de culture dans du DMEM à 10% de FCS. Après 2 jours in vitro les cultures sont alimentées chaque jour tout au long de la durée de l'étude. Quand une monocouche visible de cellules est obtenue, les cultures sont agitées 48 heures à 250 rpm et, le lendemain, les monocouches sont traitées par du cytosine arabinoside (10⁻⁵ M) pendant 48 heures. Les monocouches d'astrocytes sont ensuite amplifiées à une densité de cinq pour 35 mm sur des plaques de culture pour des flacons de culture de 25 cm² au début de l'étude.

Les cultures d'astrocytes spinaux sont composées à plus de 98% de cellules immunoréactives pour la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP).

Les monocouches d'astrocytes sont exposées soit au PBS seul (témoins) soit au produit à tester en solution dans du PBS pendant 24 heures à la concentration de 0,1 ng/ml à 10 ng/ml. Les monocouches d'astrocytes sont ensuite lavées avec du DMEM et maintenues 2 heures avec du milieu de culture où les motoneurones sont ajoutés.

Deux heures après l'alimentation et durant 2 ou 3 jours, le véhicule ou le produit à tester est encore ajouté au milieu de culture.

IDENTIFICATION IMMUNOCHIMIQUE DES MOTONEURONES

Les cellules sont fixées dans 4% de paraformaldéhyde et 0,1% de glutaraldéhyde dans 5 du PBS (pH 7,4 à 4°C pendant 15 minutes). Les cultures sont ensuite lavées et les sites non spécifiques bloqués avec 2 % d'albumine de sérum bovin (BSA) dans du PBS et 0,1 % de Triton X100^R. Ces cultures sont successivement incubées avec des anticorps de p75^{LNGRF} (article de Chandler précédemment cité), une nuit à 4°C et avec 10 du sérum de chèvre biotinylié 1/125 Gibco) et du streptavidinperoxydase (1/200, Gibco) pendant 60 minutes. Les anticorps sont visualisés en utilisant la réaction DAB/peroxyde d'hydrogène.

COMPTAGE DES CELLULES ET ANALYSE STATISTIQUE

Les cellules immunoréactives pour le récepteur neutrophine de faible activité p75^{INGFR} et exhibant des neurites plus longs que les diamètres de 4 cellules sont considérés 15 comme des motoneurones viables. Le nombre de motoneurones est évalué par comptage des cellules marquées dans une surface de 0,825 cm² sous microscope grossissant 200 fois. Les valeurs sont exprimées comme un nombre de motoneurones par cm² ou un pourcentage du nombre de motoneurones présents dans les cultures maintenues en l'absence de facteur trophique comparé au contrôle. Les expériences 20 sont réalisées au moins 3 fois.

Les analyses statistiques sont effectuées en utilisant le test de Student (t-test).

Par prétraitements avec les oligosaccharides de la présente invention, le nombre de motoneurones qui poussent sur la monocouche d'astrocytes est augmenté de 20 à 50%.

25 Les exemples suivants sont représentatifs de la préparation des oligosaccharides de formule (I) et des intermédiaires.

Dans ces exemples les significations des abréviations sont les suivantes :

Δ Is : (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-enopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium ou bien Δ UAp2S- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

5 Is : (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium ou bien α -L-IdoAp2S- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

10 IIs : (acide α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranose, sel de trisodium ou bien α -L-IdoAp- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

IIIs : (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino- α -D-glucopyranose, sel de trisodium ou bien α -L-IdoAp2S- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S

IdoAp : acide idopyranosyluronique

GlcNp : 2-amino-2-déoxy-glucopyranose

15 Δ Uap : acide 4-déoxy- α -L-thréo-hex-enopyranosyluronique

S : sulfate.

EXEMPLES DE PREPARATION DES MELANGES INTERMEDIAIRES DE FORMULE (II)

EXEMPLE A - préparation des oligosaccharides de formule (II) pour lesquels n = 0, 1
20 et 2 par dépolymérisation enzymatique et séparation

Dissoudre 25 g d'héparine dans 250 ml d'une solution tampon phosphate contenant 0,05 mol/l NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH = 7), 0,2 mol/l de chlorure de sodium et 2 % de BSA (Albumine de Sérum Bovin). On introduit dans le mélange 7 UI d'héparinase I

(EC 4.2.2.2.7) et la solution obtenue est refroidie à 15°C puis maintenue à cette température pendant toute la durée de la réaction de dépolymérisation. L'avancement de la réaction est suivie par des prélèvements échelonnés d' aliquotes et analysés par chromatographie sur perméation de gel. Au bout de 9 jours, la réaction enzymatique 5 est arrêtée en chauffant le milieu réactionnel à 100°C pendant deux minutes. Le mélange refroidi est ensuite lyophilisé. On obtient ainsi un mélange d'oligosaccharides (III).

Le mélange d'oligosaccharides (III) obtenu est ensuite chromatographié selon la méthode suivante : La chromatographie s'effectue sur des colonnes remplies avec du 10 gel polyacrylamide-agarose connu sous la dénomination Ultrogel ACA 202 et le mélange est élué par une solution contenant un tampon phosphate (0,02 mol/l NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) pH = 7 et 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La détection est réalisée en spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les produits peuvent être 15 éventuellement purifiés par chromatographie SAX (strong anion exchange) ou par précipitation fractionnée selon la méthode décrite dans le brevet FR 2548672. Les fractions de produit récupéré sont lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel sephadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Par cette méthode, on obtient 3 g de disaccharide ΔIs, 1100 mg d'un mélange 20 d'hexasaccharide contenant typiquement 55 % de dérivé ΔIs-Is-Is, 35 % de ΔIs-Is-IIIs et 10 % de ΔIs-Is-IIIIs. Ce dernier mélange peut être purifié selon les méthodes connues de l'homme du métier pour en séparer chacun des constituants ou utilisé tel quel pour la transformation en dérivés réduits de formule (I).

EXAMPLE B - préparation des oligosaccharides de formule (II) pour lesquels n=0, 1, 2, 3 ou 4 par dépolymérisation de l'ester benzylique d'héparine et séparation

25 a - **Préparation de l'ester benzylique de l'héparine**

L'ester benzylique de l'héparine est préparé selon l'exemple 3 du brevet US 5,389,618.

b- Dépolymérisation

Dissoudre 100 g d'ester benzylique de l'héparine dans 1,9 l d'eau déminéralisée. Le mélange est porté à 60°C sous agitation. Après l'obtention d'une solution homogène, on introduit en une seule fois environ 35 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 23 %. Après 10 minutes de réaction, la solution est ensuite refroidie et neutralisée par

5 80 ml d'une solution d'acide acétique environ 2 N. A cette solution, on ajoute 10 % en poids/volume d'acétate de sodium. Le mélange d'oligosaccharides est précipité par addition d'environ 2 volumes de méthanol. Le précipité est isolé par filtration, lavé au méthanol à deux reprises puis séché sous pression réduite à 50°C. Après séchage, on obtient 73,8 g d'un mélange d'oligosaccharides (II).

10 c- Enrichissement en oligosaccharide pour lequel $n = 1$

Dissoudre 30 g du mélange d'oligosaccharides obtenu précédemment dans environ 35 volumes d'eau. Cette solution est ultrafiltrée sur membrane 3 kDa (Pellicon). Lorsque 600 ml de perméat ont été soutirés, on dilue le rétentat par 500 ml d'eau. L'opération est poursuivie jusqu'à soutirer de 450 ml de perméat supplémentaires. Les deux

15 fractions de perméat sont réunies puis concentrées à sec sous pression réduite. On obtient 6,1 g d'un solide blanc jaunâtre. L'analyse du solide par chromatographie de perméation sur gel indique qu'il contient environ 30 % d'oligosaccharide de formule (II) pour lequel $n=1$.

d - Fractionnement des mélanges d'oligosaccharides ultrafiltrés

20 Le mélange enrichi est fractionné sur des colonnes remplies avec du gel polyacrylamide-agarose connu sous la dénomination Ultrogel ACA 202 (on utilise 4 colonnes en série d'un diamètre de 10 cm et d'une hauteur de 50 cm). 5 g du mélange enrichi par ultrafiltration sont dissous dans 25 ml d'eau puis élués par une solution 0,2 mol/l de chlorure de sodium à la vitesse de 5 ml/min. On recueille en bas de

25 colonne des fractions de 25 ml. La détection des produits est réalisée en spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les fractions de produit pour lequel $n = 1$ sont récupérées, lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel Sephadex G10. Après lyophilisation, on obtient 1g de tétrasaccharide contenant typiquement 70 % de

dérivé Δ Is-Is de formule II ($R_1, R_2, R_3, R_5, R_7, R_8 = SO_3Na$; $R_4, R_6 = H$ et $M = Na$). Le dérivé Δ Is-Is peut être éventuellement purifié par chromatographie SAX (strong anion exchange) ou selon un aspect préférentiel par précipitation fractionnée selon la méthode décrite dans le brevet FR 2548672 et la variante décrite dans la présente

5 invention.

EXEMPLES DE PREPARATION DES OLIGOSACCHARIDES DE FORMULE (I)

EXEMPLE 1

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 300 mg d'un oligosaccharide de formule (II) dans laquelle n est égal à 0, R_1, R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_6 10 représente un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 2 ml d'eau. Sous agitation, on ajoute en une fois 212 mg de borohydrure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Le mélange est agité 1 heure puis on réajuste le pH à 6,7 par addition de 15 soude à 0,5 mol/l. Le mélange est alors concentré à sec à 50°C sous pression réduite. Le concentrat est dispersé sous agitation magnétique dans 10 ml de méthanol. Après une nuit de sédimentation, la suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B. Le solide sur filtre est dissous par passage de 2 portions de 10 ml d'eau distillée. Cette solution est alors concentrée à sec à 50°C sous pression réduite. On obtient 580 mg 20 d'un solide blanc. Le solide est ensuite dispersé sous agitation magnétique dans 15 ml de méthanol. Après 30 minutes d'agitation, la suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B. Le gâteau est dissous par passage de 2 portions de 10 ml d'eau distillée. La solution obtenue est concentrée à sec à 50°C sous pression réduite. On obtient ainsi 250 mg d'un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 0, 25 R_1, R_7 et R_8 représentent un radical SO_3M , R_6 représente un atome d'hydrogène et M est sodium, sous la forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de I à II les sucres constitutifs des disaccharides, I étant le résidu réduit et II le résidu acide uronique insaturé [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-

(1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-D-glucitol, sel de tétrasodium); (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-D-manitol, sel de tétrasodium) : Spectre proton dans D₂O, 600MHz, T=305K, δ en ppm: 3,38 (1H, m, H-2^(I)), 3,70 et 3,75 (1H chacun, respectivement dd, J=6 et 12Hz et dd, J=5 et 12Hz, 2H-1^(I)), 3,86 (1H, t, J=5Hz, H-3^(I)), 4,13 (1H, dd, J=8 et 11Hz, H-6^(I)), 4,18 (1H, m, H-4^(I)), 4,25 (2H, m, H-6^(I) et H-3^(II)), 4,35 (1H, m, H-5^(I)), 4,65 (1H, m, H-2^(II)), 5,67 (1H, s, H-1^(II)), 6,00 (1H, d, J=5Hz, H-4^(II)).

EXEMPLE 2

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 60 mg d'un oligosaccharide de formule (II) dans laquelle n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 1,2 ml d'eau. Sous agitation, on ajoute en une fois 18 mg de borohydrure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Le mélange est agité 1 heure puis on ajoute 5 ml de méthanol. La suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B et le solide récupéré est rincé par 2 fois 0,5 ml de méthanol. Après séchage, on obtient 42 mg d'un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de I à IV les sucres constitutifs des tétrasaccharides, I étant le résidu réduit et IV le résidu acide uronique insaturé [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-D-glucitol, sel d'octasodium); (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1→4)-2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-D-manitol, sel d'octasodium) : Spectre proton dans D₂O, 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,25 (1H, dd, J=10 et 3Hz, H-2^(III)), 3,37 (1H, m, H-2^(I)), 3,59

(1H, m, H-3^(III)), 3,75 (2H, m, 2H-1^(I)), 3,79 (1H, t, J=9Hz, H-4^(III)), 3,86 (1H, m, H-3^(I)), entre 4,05 et 4,40 (10H, massif, H-4^(I)/H-5^(I)/2H-6^(I), H-2^(II)/H-3^(II)/H-4^(II)), 2H-6^(III), H-3^(IV)), 4,58 (1H, m, H-2^(IV)), 4,60 (1H, m, H-5^(II)), 5,27 (1H, d, J=4Hz, H-1^(III)), 5,42 (1H, d, J=4Hz, H-1^(III)), 5,47 (1H, d, J=2Hz, H-1^(IV)), 5,95 (1H, d, J=5Hz, H-5 4^(IV))].

EXEMPLE 3

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 100 mg d'un oligosaccharide de formule (II) dans laquelle n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 2 ml 10 d'eau. Sous agitation, on ajoute en une fois 20 mg de borohydrure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Le mélange est agité 1 heure puis on réajuste le pH à 6,7 par addition de soude à 0,5 mol/l. Le mélange est alors dilué avec de l'eau 15 distillée en quantité suffisante pour obtenir 20 ml. On ajoute 2,5 g d'acétate de sodium et on coule 3 volumes de méthanol. La suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B et le solide récupéré est rincé par 2 fois 2 ml de méthanol. Après séchage, on obtient 61 mg d'un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un 20 atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de I à VI les sucres constitutifs des hexasaccharides, I étant le résidu réduit et VI le résidu acide uronique insaturé. [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α-D-glucopyranosyl-(1→4)- acide 2-O-sulfo- α-L-idopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy- 25 2-sulfoamino-6-O-sulfo- α-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo- α-L-idopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-D-glucitol, sel de dodécasodium) ; (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino- α-D-glucopyranosyl-(1→4)- acide 2-O-sulfo- α-L-idopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino- α-D-

glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-*O*-sulfo- α-L-idopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino-D-manitol, sel de dodécasodium) : Spectre proton dans D₂O, 600MHz, T=305K, δ en ppm: 3,25 (2H, m, H-2^(III) et ^(V)), 3,38 (1H, m, H-2^(I)), 3,61 (2H, t, J=10Hz, H-3^(III) et ^(V)), entre 3,70 et 3,83 (4H, massif, 2H-1^(I) et H-4^(III) et ^(V)), 5 3,86 (1H, t, J=5Hz, H-3^(I)), 4,00 (2H, m, H-5^(III) et ^(V)), 4,07 (1H, m, H-4^(IV)), 4,08 (1H, m, H-4^(I)), entre 4,10 et 4,45 (13H, massif, H-5^(I)/2H-6^(I), H-2^(III)/H-3^(III)/H-4^(III), 2H-6^(III), H-2^(IV)/H-3^(IV), 2H-6^(V), H-3^(VI)), 4,60 (1H, s, H-2^(VI)), 4,62 (1H, s, H-5^(III)), 4,78 (1H, s, H-5^(IV)), 5,17 (1H, s, H-1^(IV)), 5,28 (1H, d, J=4Hz, H-1^(III)), 5,38 (1H, d, J=3Hz, H-1^(V)), 5,44 (1H, d, J=3Hz, H-1^(III)), 5,47 (1H, d, J=2Hz, H-1^(VI)), 5,96 (1H, d, J=5Hz, 10 H-4^(VI))].

EXAMPLE 4

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 100 mg d'un oligosaccharide de formule (II) dans laquelle n est égal à 3, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 2 ml 15 d'eau. Sous agitation, on ajoute en deux fois 30 mg de borohydure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Le mélange est agité 1 heure puis on réajuste le pH à 6,7 par addition de soude à 0,5 mol/l. Le mélange est alors dilué avec de l'eau 20 distillée en quantité suffisante pour obtenir 20 ml. On ajoute 2 g d'acétate de sodium et on coule 3 volumes de méthanol. La suspension est filtrée sur membrane Whatman GF/B et le solide récupéré est rincé par 2 fois 1 ml de méthanol. Après séchage, on obtient 68 mg d'un solide blanc. Après contrôle CLHP (Chromatographie Liquide Haute Pression), le produit n'étant pas totalement réduit, on renouvelle de façon 25 complète les toutes opérations précédentes. Après séchage, on obtient 45 mg d'un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 3, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de I à VIII les sucres constitutifs des octasaccharides, I étant le résidu réduit et VIII le résidu acide

uronique insaturé, [(acide 4-déoxy-2-*O*-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-

5 déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino-D-glucitol, sel d'hexadécasodium) ; (acide 4-déoxy-2-*O*-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-

10 6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1 \rightarrow 4)- 2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- acide 2-*O*-sulfo- α -L-idopyranosyluronique-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-6-*O*-sulfo-2-sulfoamino-D-mannitol, sel d'hexadécasodium) : Spectre proton dans D₂O, 600MHz, T=305K, δ en ppm: 3,25 (3H, m, H-2^(III), H-2^(V), H-2^(VII)), 3,38 (1H, m, H-2^(I)), 3,61 (3H, m, H-3^(III), H-3^(V), H-3^(VII)), entre 3,70 et 3,83 (5H, massif, 2H-1^(I) et H-4^(III), H-4^(V), H-4^(VII)), 3,86 (1H, t, J=5Hz, H-3^(I)), 4,00 (3H, m, H-5^(III), H-5^(V), H-5^(VII)), 4,08 (3H, m, H-4^(I), H-4^(IV), H-4^(VII)), entre 4,10 et 4,45 (17H, massif, H-5^(I)/2H-6^(I), H-2^(III)/H-3^(III)/H-4^(III), 2H-6^(III), H-2^(IV)/H-3^(IV), 2H-6^(V), H-2^(VI)/H-3^(VI), 2H-6^(VII), H-3^(VIII)), 4,59 (1H, s, H-2^(VIII)), 4,62 (1H, s, H-5^(I)), 4,78 (2H, s, H-5^(IV), H-5^(VI)), 5,17 (2H, s, H-1^(IV), H-1^(VI)), 5,28 (1H, d, J=4Hz, H-1^(III)), 5,38 (2H, m, H-1^(V), H-1^(VII)), 5,44 (1H, d, J=3Hz, H-1^(III)), 5,47 (1H, s, H-1^(VIII)), 5,96 (1H, d, J=5Hz, H-4^(VIII))].

EXEMPLE 5

Dans un réacteur on introduit une solution à 25°C de 65 mg d'un oligosaccharide de formule (II) dans laquelle n est égal à 4, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium, dans 1,2 ml d'eau. Sous agitation, on ajoute en une fois 18 mg de borohydrure de sodium. Le pH est alors ajusté entre 9 et 10 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on ajoute de façon progressive de l'acide acétique

5,25 (1H, m, H-1^(II)), 5,37 (3H, m, H-1^(V), H-1^(VII), H-1^(IX)), 5,42 (1H, m, H-1^(III)), 5,45 (1H, m, H-1^(X)), 5,93 (1H, d, J=5Hz, H-4^(X)).

Les médicaments selon l'invention comprennent en tant que principe actif au moins un oligosaccharide de formule (I) ou un mélange d'oligosaccharides de formule (I), 5 sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être employés par voie intraveineuse, sous-cutanée, orale, rectale, topique ou pulmonaire (inhalation).

10 Les compositions stériles pour administration intraveineuse ou sous-cutanée, sont généralement des solutions aqueuses. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation. Elles peuvent également être préparées sous forme de 15 compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

20 Comme compositions solides pour administration orale, peuvent être utilisés des comprimés, des pilules, des poudres (capsules de gélatine, cachets) ou des granulés. Dans ces compositions, le principe actif est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice, sous courant d'argon. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tels que le stéarate de magnésium ou le talc, un agent favorisant l'absorption orale, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

25 Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops et des élixirs pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions

peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales qui contiennent, outre le produit actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylèneglycols.

5 Les compositions pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes, lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

Les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée; elles sont généralement comprises entre 0,5 mg et 10 mg par 10 kg par jour par voie sous-cutanée soit 3 à 60 mg par jour pour un adulte de 60 kg.

D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

15 L'invention concerne également l'utilisation des oligosaccharides selon l'invention pour la préparation d'un médicament utile pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de nitrite oxyde (NO) ou utile pour la survie et la croissance des motoneurones.

20 L'invention est particulièrement avantageuse pour l'utilisation des oligosaccharides de formule (I) pour la préparation de médicaments utiles pour la prévention et le traitement des ischémies cérébrales, cardiaques ou vasculaires périphériques, d'ostéoarthrites, des traumatismes du système nerveux central, des traumatismes crâniens, spinaux et crano-spinaux, de la sclérose en plaques, des douleurs neuropathiques et des neuropathies périphériques, des maladies du motoneurone, de la sclérose latérale amyotrophique, du neuro-sida, de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et de la Chorée de Huntington.

25 L'invention concerne également la méthode de prévention et/ou de traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de substances

cytotoxiques telle que le nitrite oxyde (NO) et des maladies liées à la survie et la croissance des motoneurones. Les oligosaccharides de formule (I) peuvent ainsi être utilisées pour la prévention et/ou le traitement des maladies neurodégénératives pour lesquelles l'inflammation cérébrale joue un rôle délétère pouvant conduire à la mort

5 parmi lesquelles on peut citer les ischémies cérébrales, les ischémies cardiaques (infarctus du myocarde), les ischémies périphériques, les traumatismes du système nerveux central et notamment les traumatismes crâniens, spinaux et crano-spinaux, la sclérose en plaques, les douleurs neuropathiques et les neuropathies périphériques, les maladies du motoneurone comme la sclérose latérale amyotrophique, l'atrophie

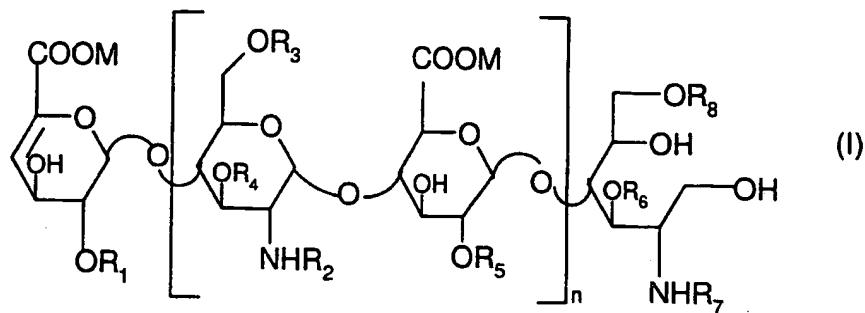
10 spinale progressive, l'atrophie musculaire infantile et la sclérose latérale primaire, le neuro-sida, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington et certaines formes d'ostéarthrites notamment à localisation articulaire.

La présente invention concerne aussi la méthode de prévention et/ou de traitement des maladies motoneuronales telles que la sclérose latérale amyotrophique, l'atrophie

15 spinale progressive, l'atrophie musculaire infantile et la sclérose latérale primaire,

REVENDICATIONS

1 - Composition pharmaceutique contenant en tant que principe actif un oligosaccharide de formule :



5 dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₈, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₇, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium ou un mélange de ces oligosaccharides.

10 2 - Composition pharmaceutique selon la revendication 1 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène ou un mélange de ces oligosaccharides.

15 3 - Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 ou 2 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est un entier de 0 à 10, un mélange de ces oligosaccharides.

4 - Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 ou 2 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est un entier de 0 à 6, un mélange de ces oligosaccharides.

20 5 - Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 ou 2 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est un entier de 1 à 6, un mélange de ces oligosaccharides.

6 - Composition pharmaceutique selon la revendication 1 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 0, R₁, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₆ représente un atome hydrogène et M est sodium.

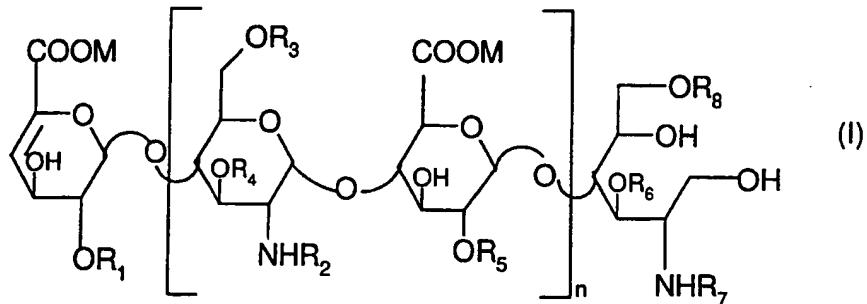
7 - Composition pharmaceutique selon la revendication 1 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

8 - Composition pharmaceutique selon la revendication 1 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

9 - Composition pharmaceutique selon la revendication 1 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 3, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

10 - Composition pharmaceutique selon la revendication 1 contenant un oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 4, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

20 11 - Oligosaccharide de formule :



dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₈, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₇, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium, à l'exception de ceux pour lesquels n est égal à 0 et soit R₁, R₆ et R₈ sont des atomes d'hydrogène, R₇ représente un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, soit R₁ et R₆ représentent un atome d'hydrogène, R₇ représente un radical COCH₃, R₈ représente un radical SO₃M et M est sodium, soit R₆ représente un hydrogène, R₁, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M et M est sodium, soit R₆ et R₇ représentent des atomes d'hydrogène, R₁ et R₈ représentent un radical SO₃M et M est sodium, soit R₁, R₆ et R₇ représentent un atome d'hydrogène, R₈ représente un radical SO₃M et M est sodium.

10 12 - Oligosaccharide de formule (I) selon la revendication 11 pour lequel R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène.

13 - Oligosaccharide de formule (I) selon l'une des revendications 11 ou 12 pour 15 lequel n est un entier de 0 à 10.

14 - Oligosaccharide de formule (I) selon l'une des revendications 11 ou 12 pour lequel n est un entier de 0 à 6.

15 - Oligosaccharide de formule (I) selon l'une des revendications 11 ou 12 pour lequel n est un entier de 1 à 6.

20 16 - Oligosaccharide de formule (I) selon la revendication 11 pour lequel n est égal à 0, R₁, R₇ et R₈ représentent un radical SO₃M, R₆ représente un atome hydrogène et M est sodium.

17 - Oligosaccharide de formule (I) selon la revendication 11 pour lequel n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un 25 atome d'hydrogène et M est sodium.

18 - Oligosaccharide de formule (I) selon la revendication 11 pour lequel n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

19 - Oligosaccharide de formule (I) selon la revendication 11 pour lequel n est égal à 5, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

20 - Oligosaccharide de formule (I) selon la revendication 11 pour lequel n est égal à 4, R₁, R₂, R₃, R₅, R₇ et R₈, représentent un radical SO₃M, R₄ et R₆ représentent un atome d'hydrogène et M est sodium.

10 21 - Procédé de préparation des oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'on fait réagir un borohydrure de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire sur des oligosaccharides de formule :

(II)

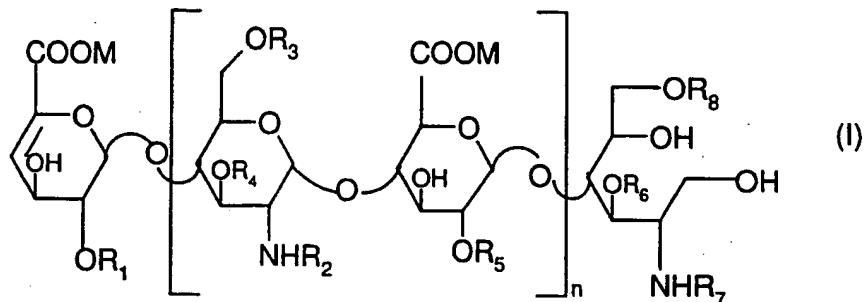
dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄ et R₅, identiques ou différents, 15 représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₆, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium et isole les oligosaccharides.

22 - Procédé selon la revendication 21 caractérisé en ce que l'on effectue la réaction en milieu aqueux, à une température voisine de 25°C et à un pH de 7 à 10.

20 23 - Procédé selon l'une des revendications 21 et 22 caractérisé en ce que le pH réactionnel est de 9 à 10.

24 - Procédé selon des revendications 21 à 23 caractérisé en ce que le borohydrure de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire est le borohydrure de lithium, sodium, de potassium ou de tétrabutylammonium.

25 - Utilisation des oligosaccharides de formule :

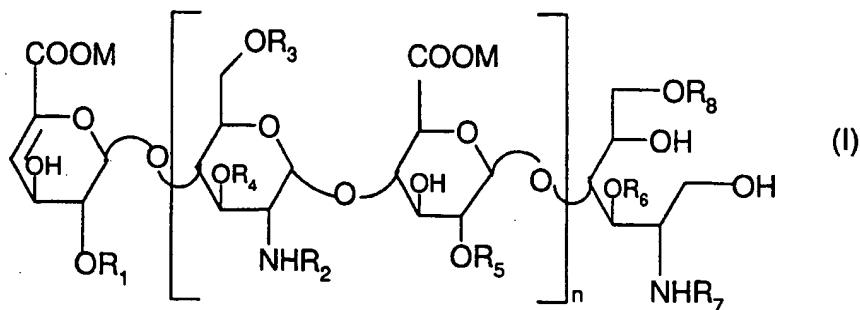


5

dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₈, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₇, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃, et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium ou un mélange de ces 10 oligosaccharides pour la préparation d'un médicament utile pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de nitrite oxyde (NO).

26 - Utilisation des oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 25 pour la préparation de médicaments utiles pour la prévention et le traitement des ischémies 15 cérébrales, cardiaques ou vasculaires périphériques, d'ostéoarthrites, des traumatismes du système nerveux central, des traumatismes crâniens, spinaux et crano-spinaux, de la sclérose en plaques, des douleurs neuropathiques et des neuropathies périphériques, des maladies du motoneurone, de la sclérose latérale amyotrophique, du neuro-sida, de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et de la Chorée de Huntington.

20 27 – Utilisation des oligosaccharides de formule (I)



dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₈, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₇, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou 5 COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium ou un mélange de ces oligosaccharides pour la préparation d'un médicament pour la prévention et/ou le traitement des maladies liées à la survie et la croissance des motoneurones.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 01/00903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H15/04 C07H5/06 C07H11/00 C07H7/033 C08B37/00
A61K31/70 A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07H C08B A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|------------------------|
| A | US 5 449 688 A (WAHL SHARON M ET AL) 12 September 1995 (1995-09-12) abstract --- | 1,25 |
| X | MCLEAN, MAITLAND W. ET AL: "Flavobacterium heparinum 2-O-sulfatase for 2-O-sulfato- Δ 4,5- glycuronate-terminated oligosaccharides from heparin" EUR. J. BIOCHEM. (1984), 145(3), 607-15, XP000974364 page 612, structures C et D --- | 11-15, 21-24 -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

*& document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
| 24 July 2001 | 03/08/2001 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer de Nooy, A |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/FR 01/00903

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | LEE, GEORGE JIA-LONG ET AL: "Separation of reduced disaccharides derived from glycosaminoglycans by high-performance liquid chromatography" J. CHROMATOGR. (1981), 212(1), 65-73, XP000867181 cited in the application page 67 ----- | 11,21 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/00903

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 5449688 | A 12-09-1995 | NONE | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. Internationale No
PCT/FR 01/00903

| | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07H15/04 C07H5/06 C07H11/00 C07H7/033 C08B37/00 A61K31/70 A61P29/00 | | | | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | | | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07H C08B A61K A61P | | | | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche | | | | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) WPI Data, EPO-Internal, CHEM ABS Data | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | | | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées | | | |
| A | US 5 449 688 A (WAHL SHARON M ET AL) 12 septembre 1995 (1995-09-12) abrégé ---- MCLEAN, MAITLAND W. ET AL: "Flavobacterium heparinum 2-O-sulfatase for 2-O-sulfato-.DELTA.4,5- glycuronate-terminated oligosaccharides from heparin" EUR. J. BIOCHEM. (1984), 145(3), 607-15, XP000974364 page 612, structures C et D ---- -/-- | 1,25 | | | |
| X | ---- | 11-15, 21-24 | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents | | <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe | | | |
| * Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou citer pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée | | | | | |
| *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *8* document qui fait partie de la même famille de brevets | | | | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale | | |
| 24 juillet 2001 | | | 03/08/2001 | | |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016 | | | Fonctionnaire autorisé de Nooy, A | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 01/00903

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | <p>LEE, GEORGE JIA-LONG ET AL: "Separation of reduced disaccharides derived from glycosaminoglycans by high-performance liquid chromatography" J. CHROMATOGR. (1981), 212(1), 65-73, XP000867181 cité dans la demande page 67</p> <p>-----</p> | 11,21 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/00903

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| US 5449688 | A 12-09-1995 | AUCUN | |